

# **Paperiteollisuuden biosidituotteen modifiointi ja tehotestaus**

Riikka Aho

Maisterintutkielma

Maaliskuu 2019

Helsingin yliopisto

Mikrobiologia ja mikrobiotekniikka

Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta

Ohjaajat:

Jaakko Ekman Ph.D., Kemira Oy

Marko Kolari Ph.D., Kemira Oy

Satu Ikävalko, Manager, Kemira Oy

Prof. Per Saris, Helsingin yliopisto

**Alkusanat:**

Tämä työ on tehty Kemira Oy:n tutkimuskeskuksessa Espoossa Mikrobiologian laboratoriossa. Laboratoriotyöt tehtiin 1.10.2018-31.12.2018 välisenä aikana. Kemiralla ohjaajina toimivat Jaakko Ekman Ph.D., Marko Kolari Ph.D. ja Satu Ikävalko, Manager. Helsingin yliopistolla ohjaajana toimi professori Per Saris.

Haluaisin kiittää kaikkia ohjaajiani saamastani avusta ja erityisen lämmin kiitos perheelleni, joka on tukenut minua saavuttamaan unelmani.

Espoossa Riikka Aho

**Käytetyt lyhenteet:**

µm	mikrometri
µl	mikrolitra
ml	millilitra
pg	pikogramma
ppm	parts per million, mg/kg eli milligrammaa kilogrammassa
vrk	vuorokausi
h	tunti
min	minuutti
mm	millimetri
µmol	mikromooli
pmy	pesäkettä muodostava yksikkö
nm	nanometri
mV	millivoltti

## TIIVISTELMÄ

Tiedekunta – Fakultet – Faculty <b>Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta</b>		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme <b>Mikrobiologian ja mikrobiotekniikan maisteriohjelma</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Riikka Aho</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Paperiteollisuuden biosidituotteen modifiointi ja tehotestaus</b>			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track <b>Mikrobiologia ja mikrobiotekniikka</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Maisterintutkielma</b>	Aika – Datum – Month and year <b>03/2019</b>	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages <b>30</b>	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Tämä työ tehtiin Kemira Oy:n Tutkimuskeskuksessa Espoossa.</p> <p>Paperikoneet ovat avoimia systeemejä, joita on mahdotonta pitää steriileinä. Paperikoneet tarjoavat mikrobeille ihanteelliset kasvuolosuhteet. Paperiteollisuuden mikrobiologisia ongelmia on raportoitu jo vuosikymmeniä ja tuotantolaitosten laajentuminen ja tuotantovesien kierrättäminen ovat lisänneet mikrobien kasvun mahdollisuuksia. Paperikoneisiin pääsee jatkuvasti mikro-organismeja raaka-aineiden, veden ja ilman välityksellä.</p> <p>Mikro-organismit aiheuttavat paljon ongelmia paperinvalmistuksessa ja mikrobikontaminaatio voi saada aikaan huomattavia taloudellisia menetyksiä. Biofilmit voivat tukkia suodattimia ja suuttimia. Biofilmiä muodostuminen aiheuttaa katkoksia prosessissa, kun koneita joudutaan puhdistamaan. Tuotetun paperin laatu heikkenee, paperiin voi tulla reikiä ja värimuutoksia. Paperiraina voi katketa ja paperikone joudutaan pysäyttämään. Biofilmit myös lisäävät paperikoneiden pintojen korroosiota.</p> <p>Paperinvalmistuksessa käytetäänkin yleisesti biosidejä mikrobien kasvun kontrolloimiseen. Biosidejä syötetään prosessiin prosessivesien mukana, eivätkä ne ole spesifisiä limaa tuottaville bakteereille. Biofilmiä bakteerit kestävät vapaana uivia bakteereita paremmin biosideja eikä biofilmi-ongelmaa ole pystytty kokonaan poistamaan.</p> <p>Paperinvalmistusprosessin eri vaiheista on löydetty paljon erilaisia mikrobeja. Paperikoneista voi löytyä viruksia, bakteereita, syanobakteereita, homeita, hiivoja, leviä ja alkueläimiä. Mikrobipopulaation koostumukseen vaikuttavat paperikoneen ympäristö ja sijainti, lämpötila, pH, raaka-aineet, mitä lisäaineita prosessissa käytetään ja minkä tyyppistä paperia tehdään.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli kehittää Kemiran jo markkinoilla olevasta biosidituotteesta halvempi, paremmin säilyvä, mutta yhtä tehokas tuote. Kemira on kehittänyt markkinoille biosidituotteen, jossa aktiivaine on suojattu misellirakenteen sisälle. Miselli suojaa aktiivainetta kulumiselta ja hajoamiselta matkalla kohteeseen paperikoneen pinnalle.</p> <p>Kehitetyn biosidituotteen säilyvyyttä testattiin eri lämpötiloissa. Biosidin tehoa testattiin planktonisia soluja vastaan ja biofilmiä vastaan. Biosidin vaikutusta testattiin mikrobipopulaation koostumukseen DNA-pohjaisilla menetelmillä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Paperiteollisuus, paperikone, mikrobi, biosidi, biofilmi</b>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors <b>Jaakko Ekman Ph.D., Marko Kolari Ph.D, Satu Ikävalko Manager</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## ABSTRACT

Tiedekunta – Fakultet – Faculty <b>Faculty of agriculture and forestry</b>		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme <b>Master's programme of microbiology and microbiotechnology</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Riikka Aho</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Development of targeted-release biocide for paper making process</b>			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track <b>Microbiology and microbiotechnology</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Master's thesis</b>	Aika – Datum – Month and year <b>03/2019</b>	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages <b>30</b>	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>This work was done at R&amp;D Center of Kemira Oy in Espoo.</p> <p>Paper machines are open systems which are impossible to keep sterile. Paper machines offer favourable conditions for microbial growth. Microbiological problems in paper industry have been reported for years and expanding the production facilities and recycling of process waters have increased microbial growth.</p> <p>Microorganisms cause a lot of problems in paper machines and contaminations can lead to huge economical losses. Biofilms can block filters and nozzles. Biofilms cause production breakdowns. The quality of produced paper is deteriorated, produced paper can have holes and discolourations. Sometimes the paper machine has to be stopped. Biofilms also increase the corrosion of machinery.</p> <p>Biocides are commonly used to control the formation of biofilms. Biocides are dosed with process waters and they are not specific to biofilm forming bacteria. Biofilms tolerate biocides better than planktonic bacteria and the biofilm problem has not been able to solve.</p> <p>There are a lot of different microbes found on paper making processes. Paper machines can contain viruses, bacteria, cyanobacteria, molds, yeasts, algae and protozoa. Paper machines environment and location, temperature, pH, raw materials and other additives have impact on the composition of microbe population.</p> <p>Kemira has a targeted-release biocide product on the market. Polymeric micelles protect biocidal active agents from degradation while it has been delivered to the targeted surfaces. Global patent has been applied for this targeted-release technology. Target of this work was to develop a cheaper version of this product having same targeted effects and better storage stability</p> <p>In this work the stability, efficacy against planktonic cells and against biofilm were tested. qPCR and sequencing were used to test the effect of the biocide to microbe population.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Paper industry, paper machine, biocide, biofilm, microbe</b>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors <b>Jaakko Ekman Ph.D., Marko Kolari Ph.D, Satu Ikävalko Manager</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## JOHDANTO

**Paperinvalmistuksen mikrobiologiset ongelmat.** Paperikoneet ovat avoimia systeemejä, joita on mahdotonta pitää steriileinä. Paperikoneet tarjoavat mikrobeille ihanteelliset kasvuolosuhteet (Flemming et al. 2013). Paperikoneiden prosessivedet sisältävät suuria määriä puusta peräisin olevia biologisesti hajoavia aineita (selluloosa, hemiselluloosa, tärkkelys ja hartsi), joita mikrobit käyttävät ravinteina (Granhall et al. 2010, Klahre et al. 2000, Väisänen et al. 1994). Lämpötila vaihtelee 30 °C ja 50 °C välillä, ilmankosteus on korkea ja pH on välillä 4-10 (Desjardins et al. 2003, Flemming et al. 2013). Paperiteollisuuden mikrobiologisia ongelmia on raportoitu jo vuosikymmeniä ja tuotantolaitosten laajentuminen ja tuotantovesien kierrättäminen ovat lisänneet mikrobien kasvun mahdollisuuksia (Väisänen et al. 1994). Paperikoneisiin pääsee jatkuvasti mikro-organismeja raaka-aineiden, veden ja ilman välityksellä. Varsinkin kierrätetty paperikuitu sisältää paljon mikrobeja (Desjardins et al. 2003, Neyret et al. 2014).

Mikro-organismit aiheuttavat paljon ongelmia paperinvalmistuksessa ja mikrobikontaminaatio voi saada aikaan huomattavia taloudellisia menetyksiä (Rochex et al. 2007, Tirola et al. 2009). Prosessivesissä vapaana kasvavat bakteerit (planktoniset bakteerit) eivät sinänsä aiheuta suuria ongelmia paperikoneelle tai paperin laadulle, ennen kuin nämä bakteerit kiinnittyvät paperikoneen pintaan ja muodostavat limaisia biofilmejä (Desjardins et al. 2003, Väisänen et al. 1998). Biofilmit voivat tukkia suodattimia ja suuttimia. Biofilmien muodostuminen aiheuttaa katkoksia prosessissa, kun koneita joudutaan puhdistamaan. Tuotetun paperin laatu heikkenee, paperiin voi tulla reikiä ja värimuutoksia. Paperiraina voi katketa ja paperikone joudutaan pysäyttämään. Biofilmit myös lisäävät paperikoneiden pintojen korroosiota (Granhall et al. 2010, Väisänen et al. 1998).



Kuva 1. Värillistä biofilmiä paperikoneen pinnassa (Kuvat M. Kolari)

Tärkeä asia, mikä tulee myös huomioida paperitehtaiden mikrobikontaminaatioissa, on siellä työskentelevien ihmisten terveys ja turvallisuus. Paperintuotannon märässä päässä on löydetty ilmasta jopa 50 kertaa enemmän bakteereita kuin kuivassa päässä. Nämä bioaerosolit voivat aiheuttaa työntekijöille esim. silmätulehduksia, jos ne sisältävät patogeeneja (Flemming et al. 2013). Anaerobisilla alueilla voi muodostua biogeenisesti metaania ( $\text{CH}_4$ ) ja vetyä ( $\text{H}_2$ ), joiden on raportoitu aiheuttaneen räjähdyksiä. Anaerobisissa ympäristöissä sulfaatinpelkistäjäbakteerit voivat muodostaa hyvin myrkyllistä rikkivetyä ( $\text{H}_2\text{S}$ ) pelkistäessään sulfaattia. Mikrobin tuottamat aineenvaihdunnan tuotteet voivat aiheuttaa pahaa hajua, mikä on myös iso ongelma paperitehtaalla työskennellessä. Yhtenä esimerkkinä fermentaatioissa muodostuvat haihtuvat rasvahapot (Flemming et al. 2013).

Paperinvalmistuksessa käytetäänkin yleisesti biosidejä mikrobin kasvun kontrolloimiseen (Klahre et al. 2000). Biosidejä syötetään prosessiin prosessivesien mukana, eivätkä ne ole spesifisiä limaa tuottaville bakteereille (Desjardins et al. 2003). Biofilmien bakteerit kestävät vapaana uivia bakteereita paremmin biosideja eikä biofilmiongelmaa ole pystytty kokonaan poistamaan (Mah et al. 2001, Stewart et al. 1998, Väisänen et al. 1994).

**Paperinvalmistuksessa esiintyvät mikrobit.** Paperinvalmistusprosessin eri vaiheista on löydetty paljon erilaisia mikrobeja. Paperikoneista voi löytyä viruksia, bakteereita, syanobakteereita, homeita, hiivoja, leviä ja alkueläimiä (Kolari M. 2007). Mikrobipopulaation koostumukseen vaikuttavat paperikoneen ympäristö ja sijainti, lämpötila, pH, raaka-aineet, mitä lisäaineita prosessissa käytetään ja minkä tyyppistä paperia tehdään (Blanco et al. 1996, Desjardins et al. 2003).

Vuosien saatossa on julkaistu paljon tietoa paperikoneista löytyneistä bakteerilajeista. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphaerotilus*, *Klebsiella* ja *Achromobacter* bakteerisukuihin kuuluvia bakteereita on löydetty monista paperitehtaista (Blanco et al. 1996).

Kanadassa Desjardins et al. (2003) eristivät lima- ja sellunäytteistä yli 100 bakteerisolaattia ja määrittivät niiden taksonomiaa sekvensoimalla niiden 16S rDNA:ta. Tulokset viittasivat siihen, että *Pseudoxanthomonas* suvun bakteereilla on tärkeä osa kanadalaisen paperitehtaan kontaminaatioissa.

Kolari et al. (2003) tutkivat paperikoneiden ruostumattomasta teräksestä tehtyjen pintojen päällä esiintyviä värillisiä limoja. He havaitsivat, että *Deinococcus geothermalis* on yleinen pinkkiä limaa muodostava bakteeri paperiteollisuudessa. He löysivät myös punaista limaa muodostavan *Meiothermus silvanus* bakteerin. Näytteistä eristettiin myös oranssia limaa muodostava *Porphyrobacterin* kaltainen bakteeri ja uusi *Roseomonas* bakteerin kaltainen laji. *D. geothermalis* ja *M. silvanus* ovat termofiilisiä bakteereita ja ne alun perin eristettiin kuumista lähteistä Portugalista. Ekman et al. (2007) löysivät *Meiothermus* suvun bakteereita 18 eri paperikoneesta neljästä eri maasta. Tämä osoittaa, että *Meiothermus* suku on laajalle levinnyt ja yleinen paperikoneiden biofilmien muodostaja.

Väisänen et al. (1994) keräsivät limanäytteitä paperikoneiden pinnalta ja näistä näytteistä löytyneet bakteerit kuuluivat enimmäkseen *Pseudomonas*, *Flavobacterium* ja *Clavibacter* sukuihin. Myöhemmin Väisänen et al. (1998) eristivät paperikoneen märästä päästä mm. seuraavia bakteereita: *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum*, *Pantoea agglomerans*, *Microbulbifer* kantoja, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus* ja muita *Bacillus* lajeja. He myös eristivät paperikoneen pinnalla olleesta värillisestä limasta *Acinetobacter radioresistens*, *Methylobacterium mesophilicum* ja *Deinococcus geothermalis* bakteerit.

Lahtinen et al. (2006) löysivät LH-PCR profiileista klooneja, jotka kuuluivat TM7 pääjaksoon, jota ei ole vielä tähän mennessä pystytty viljelemällä kasvattamaan. Biofilmin bakteeripopulaation 16S rRNA:n suora amplifikaatio voi kuitenkin paljastaa lajeja, joita ei vielä pystytä viljelemällä kasvattamaan, kuten TM7-ryhmän (Lahtinen et al. 2006).

Tirola et al. (2009) tutkivat varhaisen vaiheen biofilmin muodostusta paperikoneissa. He havaitsivat, että ensisijaiset kolonisoijat kuuluivat kahteen gram-negatiiviseen pääjaksoon: *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes*. *Tepidimonas* ja *Rhodobacter* sukujen bakteerit olivat myös vallitsevia mikrobeja tutkituissa paperikoneissa. Ensisijaiset kolonisoijat pystyvät muodostamaan biofilmiä puhtaalle pinnalle ilman muita mikro-organismeja (Rochex et al. 2007). Zumsteg et al. (2017) käyttivät NGS-sekvenointia ja löysivät myös paperikoneiden vesistä *Tepidimonas* suvun bakteereita. He löysivät lisäksi myös *Chryseobacterium* suvun bakteereita. Nämä kaksi bakteerisukua edustivat 90% kaikista löydettyistä bakteerisuvuista heidän näytteissään.



Kurissery et al. (2010) havaitsivat, että saman paperikoneen sisällä oleva biofilmi oli erilainen kuin paperikoneen pinnalla oleva. Paperikoneen eri osien erilaiset olosuhteet (esim. lämpötila) vaikuttavat biofilmin muodostumiseen ja mikrobipopulaatioon. Paperikoneen sisällä oleva biofilmi saattaakin tarvita ankaramman biosidikäsittelyn kuin pinnalla oleva biofilmi.

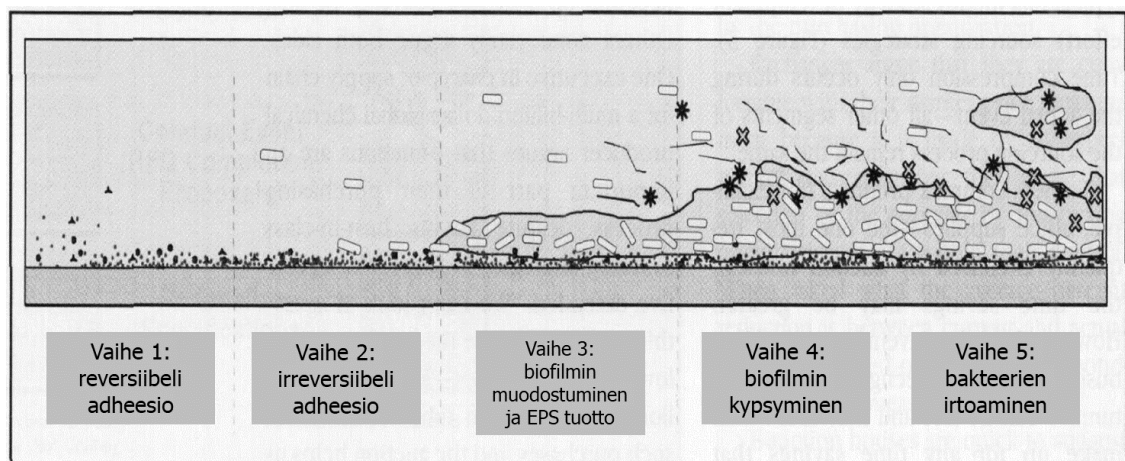
Granhall et al. (2010) ottivat näytteitä paperikoneista, joissa käytettiin kierrätettyä kuitua paperinvalmistuksessa. 16S rRNA sekvensseistä löytyi klooneja seuraavista pääjaksoista: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres*, *Firmicute*, *Proteobacteria* (alfa, gamma), *Spirochaetes*, *Tenericute* ja kahdesta ehdokas pääjaksosta OD1 ja TM7. 45% kaikista klooneista kuului *Bacteroidetes* pääjakssoon. Myös Lahtinen et al. (2006) löysivät TM7 pääjakssoon kuuluvia mikrobeja, joten tämä ryhmä saattaa olla yleinen monissa paperitehtaissa.

*Bacillus* lajeja, myös *Bacillus cereusta*, löytyy toistuvasti paperikoneiden vesistä ja limasta. Kolari et al. (2001) huomasivat, että yksin kasvaessaan *Bacillus* lajit eivät muodosta biofilmiä paperikoneen olosuhteita simuloivissa kokeissa. Paperiteollisuuden *Bacillus* lajit tarttuivat pintoihin yhdessä *Deinococcus geothermaliksen* kanssa ja muodostivat yhdessä biofilmejä. *D. geothermalis* on paperikoneilla yleinen ensisijainen kolonisoija. Joten *Bacillus* lajien torjumisessa paperikoneissa, maalitauluna kannattaakin olla ensisijainen kolonisoijabakteeri. *D. geothermalis* pystyy kylläkin muodostamaan sitkeämpiä biofilmejä kuin monet muut bakteerit ja sillä on myös parempi kyky kestää säteilyä ja kuivumista, joten sen torjuminen voi olla vaikeaa (Kolari et al. 2002).

**Biofilmit.** Biofilmit ovat matriksin ympäröimiä bakteeripopulaatioita, joissa bakteerit ovat kiinnittyneinä toisiinsa ja/tai pintoihin tai liittymäkohtiin (Costerton et al. 1995). Biofilmit koostuvat bakteerisoluista, ekstrasellulaarisesta polysakkaridikerroksesta (EPS) ja vedestä (Bunnage et al. 2000). EPS on solujen tuottamaa limaa ja koostuu polysakkarideista, proteiineista, nukleiinihapoista ja lipideistä. EPS pitää bakteerisolut yhdessä ja kiinni alustassa mihin solut ovat kiinnittyneet (Bunnage et al. 2000, De Beer et al. 2013). Mikroskoopilla tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että biofilmit eivät ole litteitä eikä mikro-organismien jakautuminen ole tasaista. Usean eri mikrobilajin muodostamista biofilmeistä on löydetty monimutkaisia rakenteita, joissa on huokosia, kanavia, koloja ja säikeitä ja solut ovat järjestäytyneet rykelmiksi tai kerroksittain (De Beer 2013). Biofilmin pinnalla aerobiset bakteerit kuluttavat happea nopeammin kuin sitä

ehtii diffundoitua syvemmälle biofilmiin. Tämä johtaa siihen, että heti aerobisten bakteerien alle muodostuu anaerobiset olosuhteet ja anaerobiset bakteerit pääsevät kasvamaan muuten aerobiseen systeemiin (Flemming et al. 2013). Biofilmien paksuus vaihtelee muutamasta mikrometristä aina senttimetriin saakka, riippuen biofilmin iästä ja kasvuolosuhteista (De Beer et al. 2013).

Biofilmin muodostuksessa on useita eri vaiheita (kuva 2). Veden peittämälle pinnalle kertyy nopeasti orgaanista ja/tai epäorgaanista ainesta ja tämä edesauttaa mikro-organismien kiinnittymistä pinnalle (Bunnage et al. 2000). Ensin bakteerit lähestyvät pintaa niin lähelle, että niiden liikkuminen hidastuu. Sitten ne liittyvät löyhästi pintaan ja/tai muihin bakteereihin, jotka ovat jo aiemmin kiinnittyneet pintaan (reversiibeli adheesio). Löyhän liittymisen vuoksi bakteerien on mahdollista etsiä sopiva paikka mihin kiinnittyä pysyvästi (irreversiibeli adheesio). Bakteerit käyttävät liikkumiseen ja sopivan kiinnittymispaikan etsimiseen tyypin IV piluksia tai flagelloja (Watnick et al. 2000). Adheesion jälkeen mikrobit alkavat lisääntyä ja muodostavat mikrobikerroksia. Tämän jälkeen alkaa EPS:n tuotanto ja syntyy biofilmi (Bunnage et al. 2000). On löydetty todisteita, että bakteereilla transkriboituu eri geenejä biofilmimuodossa kuin planktonisessa vaiheessa. Esimerkiksi flagellojen synteesi vähenee biofilmin bakteereilla ja EPS:n valmistukseen käytettävien molekyylien synteetit lisääntyvät verrattuna planktonisiin soluihin. Osa bakteereista voi irrota biofilmistä esim. ravinteiden vähentyessä ja ne voivat muodostaa uuden biofilmin (Watnick et al. 2000).



Kuva 2. Biofilmin muodostuminen paperikoneessa (alkuperäinen kuva Davis et al. 2003, Bunnage et al. 2000)

Bakteerit myös kommunikoivat toistensa kanssa biofilmissä (De Beer et al. 2013). Bakteerien välinen kommunikaatio tapahtuu yleensä sellaisten bakteerien tuottamien aineiden välityksellä, mitkä pystyvät diffundoitumaan pois yhdestä solusta ja menemään

sisälle toiseen soluun (Watnick et al. 2000). Tämän quorum sensing-mekanismin tarkoituksena on arvioida ja määrittää mikrobipopulaation tiheyttä. Monet bakteerit käyttävät tätä mekanismia varmistaakseen, että tarvittava määrä soluja on paikalla, jotta voidaan aktivoida tietty toiminto, joka vaatii toimiakseen kunnolla tietyn solutiheyden. Quorum sensing on yleistä gram-negatiivisilla bakteereilla, mutta sitä on tavattu myös monissa gram-positiivisissa bakteereissa (Madigan et al. 2017).

Yksi oleellinen biofilmien ominaisuus on niiden luontainen kyky kestää antibiootteja ja muita antimikrobisia kemikaaleja (Bridier et al. 2011, Flemming et al. 2013, Kurissery et al. 2010). Biofilmissä kasvavilla bakteereilla voi olla jopa tuhat kertaa parempi sietokyky antimikrobisille aineille kuin saman lajin planktonisilla soluilla (Madigan et al. 2017 s. 657). Syitä tälle suuremmalle sietokyvylle ovat bakteerien hitaampi kasvuvauhti biofilmissä, EPS:n kyky hidastaa antimikrobisten aineiden tunkeutumista biofilmiin ja biofilmissä kasvavien bakteerien geeniekspressio, joka lisää niiden stressinsietokykyä (Bridier et al. 2011, Mah et al. 2001). De Beer et al. (1994) mittasivat klooritasoja *Pseudomonas aeruginosa* ja *Klebsiella pneumoniae* yhdessä muodostamista biofilmeistä ja vain 20% alkuperäisen liuoksen konsentraatiosta pystyttiin mittaamaan biofilmeistä. Jang et al. (2006) puolestaan osoittivat, että kloori ei tunkeutunut kuin 100 µm:n syvyyteen biofilmiin, jonka paksuus oli 150-200 µm. Stewart et al. (1998) testasivat neljää eri biosidia keinotekoiselle *Enterobacter aerogenes* biofilmille ja havaitsivat myös, että biofilmi on vähemmän herkkä kaikille testatuille antimikrobisille aineille verrattuna planktonisiin soluihin.

Biofilmin pinta altistuu antimikrobiselle aineelle, mutta kun biosidi saavuttaa biofilmin sisäosan, se pitoisuus on saattanut alentua tehottomalle tasolle (Stewart et al. 1998).

**Biosidit.** Biosidit ovat tuotteita, joita käytetään mikrobien kasvun hillitsemiseen. Ne toimivat joko tappamalla mikro-organismeja tai rajoittamalla niiden kasvua. Potentiaalisia biosidien maalitauluja ovat soluseinä tai ulompi kalvo, solukalvo, toiminnalliset ja rakenteelliset proteiinit, DNA, RNA, ja muut solun rakenneosat (Bridier et al. 2011). Hyvän biosidin pitäisi olla käyttökelpoinen laajoilla pH- ja lämpötila-alueilla, se ei saisi häiritä muita paperitehtaan käyttämiä kemikaaleja, sen pitäisi olla laajakirjoinen mikrobeja vastaan, sen pitäisi olla tehokas ja nopeasti vaikuttava, olla ympäristöystävällinen ja myrkytön ja turvallinen työntekijöille. Hyvän biosidin tulisi myös olla helposti käsiteltävissä ja sillä tulisi olla alhaiset käyttökustannukset. Tällaista biosidiä

ei kuitenkaan ole olemassa ja eivätkä kaikki biosidit sovi kaikille sovelluksille. Biosidien valinta tulee aina tehdä paikkakohtaisesti (Kiuru et al. 2010). On yleistä jakaa biosidit käyttösovelluksen mukaan säilöntäaineiksi ja liman torjunta-aineiksi. Vaikka joskus ihan samaa kemiallista ainetta käytetäänkin molempiin tarkoituksiin (Kolari M 2007, s. 192).

Biosidit jaetaan ei-hapettaviin ja hapettaviin biosideihin ja ne ovat yleensä myrkyllisiä, laajakirjoisia antimikrobisia aineita. Biosideilla on erilaisia antimikrobisia mekanismeja ja ne eroavat myös reaktiokykynsä mukaan. Esimerkiksi glutaraldehydi reagoi nopeasti proteiinien amino- ja tioliryhmien kanssa aiheuttaen peruuttamattomia ristikkäissidoksia. Tämä johtaa siihen, että solut eivät pysty suorittamaan tärkeitä toimintoja ja kuolevat. Kationiset pintajännitystä alentavat aineet, kuten kvaternääriset ammoniumyhdisteet, imeytyvät solun pinnalta ja muuttavat solukalvon läpäisevyyttä ja näin vahingoittavat solua. Erilaiset isotiatsolit ovat yleisiä biostaattisia aineita paperiteollisuudessa. Muita yleisesti käytössä olevia ei-hapettavia biosideja ovat DBNPA (2,2-dibromo-3-nitripropionamide), MBT (methylene bis(thiocyanate)), bronopoli (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol), THPS (tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulphate), dazomet (3,5-Dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione), TCMBT (2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole) ja erilaiset karbamaatit (Kolari M 2007 s. 192-193).

Hapettavat biosidit ovat melko nopeasti tappavia. Niiden pääkohteena ovat solun proteiinit. Tarpeeksi isolla pitoisuudella ja tarpeeksi pitkällä kontaktiajalla, ne pystyvät tappamaan kaiken tyyppisiä bakteereita, myöskin itiöitä muodostavia ja anaerobisia bakteereita. Hapettavat biosidit myös tehostavat muiden biosidien vaikutusta ja ne myös vähentävät anaerobisia olosuhteita ja täten lieventävät anaerobisten bakteerien aiheuttamia hajuhaittoja (Paulus W 2005 s. 389). Hapettavat biosidit ovat yleisesti halvempia kuin tavanomaiset biosidit, mutta niiden annostelun kanssa tulee olla varovainen. Hapettavat biosidit voivat lisätä paperikoneiden korroosiota ja reagoida muiden paperinvalmistuksen kemikaalien kanssa (Davis et al. 2003). Paperinvalmistuksessa käytetyt yleisimmät hapettavat biosidit ovat: natriumhypokloriitti, natriumhypobromiitti, klooridioksidi, BCDMH (1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin), peretikkahappo ja kloramiini (Paulus W 2005 s. 389).

Sopivan biosidiohjelman suunnitteluun vaikuttaa monta asiaa, kuten kohdeorganismi, pH, lämpötila ja muut ympäristötekijät. Biosidien käyttö onnistuu parhaiten, kun niiden rakenne, ominaisuudet ja vaikutusmekanismi tunnetaan hyvin (Pereira et al. 2001). Liian vähäinen biosidien käyttö vaarantaa paperikoneen ajettavuuden ja paperin laadun.

Kun taas liiallinen biosidien käyttö on kallista ja voi johtaa ei-toivottuihin reaktioihin prosessin muiden kemikaalien kanssa. Suunnitteluun vaikuttavat myös mihin kohtaan prosessia biosidia halutaan käyttää, mikä on lopullinen kohde, mitä muita kemikaaleja paperikoneessa käytetään ja mikä on prosessin pH (Kiuru et al. 2010). Myös monien biosidien käyttö on nykyään kielletty johtuen lainsäädännön tiukentumisesta koskien ympäristönsuojelua ja työntekijöiden turvallisuutta. Tutkijat yrittävätkin kehittää uusia tehokkaita biosideja, jotka vastaavat nykyisiä vaatimuksia (Kolari M 2007 s. 192-193, Neyret et al. 2014).

## MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää Kemiran jo markkinoilla olevasta biosidituotteesta halvempi, paremmin säilyvä, mutta yhtä tehokas tuote. Kemira on kehittänyt markkinoille biosidituotteen, jossa aktiivaine on suojattu misellirakenteen sisälle. Miselli suojaa aktiivainetta kulumiselta ja hajoamiselta matkalla kohteeseen paperikoneen pinnalle.

**Näytteet ja bakteerikannat.** Tässä työssä käytettiin erään suomalaisen kierrätyskuitua käyttävän kartonkitehtaan pulpperoitua kuitua ja kiertovettä. Juuri pulpperoitua kuitua ja kiertovettä sekoitettiin suhteessa 1:3, jotta massaa olisi helpompi käsitellä.

Tehotesteissä biofilmiä vastaan käytettiin bakteerikantana *Meiothermus silvanus* c-wire-CTYE-1 (Helsingin yliopisto), joka tunnetusti muodostaa värillistä biofilmiä paperikoneissa. *M. silvanus* on termofiilinen bakteeri, joka alun perin eristettiin kuumasta lähteestä Portugalista (Tenreiro S et al. 1995). *M. silvanus* käyttää rihmamaisia soluelimiä kiinnittymiseen ja biofilmin muodostamiseen ruostumattomilla teräspinnoilla. *M. silvanus* on gram-negatiivinen sauva ja se muodostaa oranssinpunaisia pesäkkeitä ja optimi pH on välillä 8,0-8,5 (Sikorski et al. 2010).

**Formulointityöt.** Tämän työn tarkoituksena oli kehittää jo markkinoilla olevasta biosidituotteesta halvempi ja paremmin säilyvä, mutta yhtä tehokas versio. Työ aloitettiin kehittämällä uusia reseptejä ja formuloimalla uusia biosidiversioita. Eri reseptejä tehtiin yhteensä 32 kpl. Tarkemmat reseptit ovat salaista tietoa.

Markkinoilla olevassa tuotteessa ja uusissa formuloiduissa biosidiversioissa, aktiivaineena on DBNPA (2,2-dibromo-3-nitripropionamide), joka on yleisesti käytetty ei-hapettava biosidi. DBNPA on nopeatehoinen alhaisilla pitoisuuksilla ja sen hajoamistuotteet ovat melko myrkyttömiä (ammoniakki, hiilidioksidi ja bromidi-ionit). Tämän vuoksi DBNPA on kustannustehokas ja ympäristöystävällinen biosidi (Eachus et al. 2004)

**Säilyvyystestit.** Formuloituja biosideja säilytettiin eri lämpötiloissa (+5 °C, huoneenlämpö +22 °C, +35 °C, +40 °C ja +45 °C) ja niiden ulkonäköä seurattiin säännöllisin väliajoin. Liuosten haluttiin säilyvän kirkkaana, mielellään värittöminä eikä liuosten pinnalle haluttu muodostuvan erillistä faasikerrosta.

Säilyvyysnäytteistä määritettiin myös aktiivaiineen (DBNPA) pitoisuus eri aikapisteissä nestekromatografilla Kemiran Analyttisessä laboratoriossa.

**pH-, hapetus-pelkistys- ja ATP-mittaukset.** pH- ja hapetus-pelkistys (redox) mittaukset tehtiin Handylab 100 pH/mV-mittarilla (SI Analytics).

Adenosiinitrifosfaatti (ATP)-mittaukset tehtiin Lumikem Process Lite Test kitillä (Kemira #LKM-PROL-100) ja näytteen tuottama valo mitattiin luminometrillä (Kikkoman Lumitester C-110). Lumikem kitin KemiCal1 (KC1) kalibrointi muuttaa luminometrin Relative Light Unit (RLU) arvot varsinaisiksi ATP-pitoisuuksiksi (pg ATP ml<sup>-1</sup>). Kalibrointi suoritetaan kerran päivässä. Kaksi tippaa (100 µl) KemiCal1 liuosta ja 400 µl KemiZyme lusiferaasi entsyymiliuosta sekoitetaan putkessa ja mitataan heti luminometrillä. Luminometrin antama RLU-arvo kirjoitetaan muistiin. 100 µl näytettä ja kaksi tippaa (100 µl) KemiLyze uuttoliuosta sekoitetaan putkessa ja putkea inkuboidaan vähintään yksi minuutti. Putkeen lisätään 400 µl KemiZyme lusiferaasi entsyymiliuosta ja mitataan heti luminometrillä. Laitteen antama RLU-arvo kirjoitetaan muistiin. Varsinainen ATP-pitoisuus lasketaan kaavalla:

$$\frac{RLU(näyte)}{RLU(KC1)} * 2000 \text{ (pg ATP ml}^{-1}\text{)}$$

ATP-mittauksia on yleisesti käytetty teollisuudessa mittaamaan bakteerisolujen elävyyttä. Mittaukset ovat helppoja ja nopeita tehdä ja tuloksen saa hetkessä.

**Tehotestit planktonisia soluja vastaan.** Tehotesteissä planktonisia soluja vastaan näytteenä käytettiin kartonkitehtaan kiertovettä, jossa oli mukana pulpperoitua kuitua.

Tehtaalta otettu kiertovesi oli lämpötilaltaan noin +28° C. Kiertovettä, jossa mukana kuitua, pipetoitiin steriileihin pulloihin 50 ml/pullo. Testissä käytetyistä biosideista valmistettiin 10 000 ppm stokkiliuokset +45° C hanaveteen mittapulloissa. Laskettiin

kuinka paljon 10 000 ppm stokkiliuosta pitää lisätä näytteeseen, jotta lopulliset biosidipitoisuudet olisivat 120, 180 ja 240 ppm. Laskut tehtiin kaavalla:

$$c1 * V1 = c2 * V2 \rightarrow V1 = \frac{c2 * V2}{c1}$$

jossa c1 on stokkiliuoksen pitoisuus (ppm), V1 on stokkiliuoksen pipetoitava tilavuus (ml), c2 on näytteen lopullinen biosidipitoisuus (ppm) ja V2 on näytteen tilavuus (ml).

Biosidit pipetoitiin näytepulloihin ja pulloja säilytettiin noin +28 °C lämpötilassa kolme tuntia. Näytteistä tehtiin laboratoriossa laimennossarjat  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  Dilucup/Dilushaker-systeemillä (LabRobot 40DENACL6/40DS42PRXT). Dilucupit ovat valmiiksi täytettyjä kuppeja, joissa on 9 ml steriiliä NaCl-liuosta. Diluceja voidaan sekoittaa niille suunnitellulla Dilushaker-ravistelijalla. Laimennoksista viljeltiin pintaviljelytekniikalla aerobiset bakteerit LNA-maljoille (resepti salainen) niin, että maljoilla oli laimennokset  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ja  $10^{-7}$ . Anaerobiset *Clostridium* bakteerit viljeltiin clostridium-maljoille (Reinforced Clostridial agar, Oxoid CM0151) maljavalutekniikalla niin, että maljoilla oli laimennokset  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  ja  $10^{-6}$ . Hiivat ja homeet viljeltiin SDA-maljoille (Sabouraud 4% dextrose agar, Merck 105438) pintaviljelytekniikalla niin, että maljoilla oli laimennos  $10^{-6}$ . LNA-maljoja kasvatettiin +37 °C 2 vrk, Clostridium-maljoja kasvatettiin anaerobisissa olosuhteissa +37 °C 5 vrk ja SDA-maljoja kasvatettiin +37 °C 3 vrk. Näytepullot laitettiin +45 °C lämpötilaan 150 rpm ravisteluun ja aerobiset viljelyt toistettiin LNA-maljoille 24 h kuluttua biosidien lisäämisestä. Näytteistä mitattiin pH- ja hapetus-pelkistys (redox) potentiaalit ennen biosidien lisäämistä, 3 h inkuboinnin jälkeen ja 24 h inkuboinnin jälkeen.

**Tehotestit biofilmiä vastaan.** Tehotestit biofilmiä vastaan tehtiin steriileillä 96-kuoppalevyillä (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates, Thermo Scientific 167008). Bakteerikantana käytettiin *Meiothermus silvanus* e-wire-CTYE-1 (Helsingin yliopisto), joka tunnetusti muodostaa värillistä biofilmiä paperikoneissa [29]. Bakteerikannasta tehtiin puhdasviljelmä LNA-maljalle ja maljaa kasvatettiin 2-4 vrk +45 °C. Maljalta siirrostettiin yksi pesäke 10 ml ravinneliuosliemeen, jossa on 7,5 ml SPV (Simuloitu prosessivesi, resepti salainen) ja 2,5 ml R2A-lientä (Reasoner's 2A broth). Ymppiä kasvatettiin 6 tuntia +45° C 150 rpm ravistelussa. Ympin elävyys mitattiin kasvatuksen jälkeen prosessi-ATP-kitillä (Kemira LumiKem Process Lite Test Kit). ATP-pitoisuuden haluttiin olevan välillä 50 000-100 000 pg ml<sup>-1</sup>. Kahta kuoppalevyä varten valmistettiin



liuos, jossa oli 40 ml SPV, 4 ml R2A-lientä ja 400 µl ymppeä. Tätä pipetoitiin kuoppalevyjen kuoppiin 180 µl/kuoppa. Kuoppalevyjen päälle asetettiin piikkikannet (Nunc™ Immuno TSP lids, Thermo Scientific 445497) ja levyjä inkuboitin +45 °C 150 rpm ravistelussa 24 h.

Seuraavana päivänä tutkittavista biosideistä tehtiin 1000 ppm stokkiliuokset +45 °C hanaveteen mittapulloihin. Stokkiliuoksista tehtiin laimennokset, joiden biosidipitoisuudet olivat 3, 8, 15, 22, 30, 40, 50 ja 60 ppm. Laimennokset tehtiin simuloituun prosessiveteen (SPV). Biosidiliuoksia pipetoitiin tyhjille kuoppalevyille 200 µl/kuoppa. Piikkikannet asetettiin biosidikuoppien päälle ja levyjä inkuboitin +45 °C lämpötilassa 30 min. Sillä aikaa valmistettiin uusi kasvatusliemi, 40 ml SPV + 14 ml R2A-liemi. Kasvatuslientä pipetoitiin tyhjiin kuoppalevyihin 180 µl/kuoppa. Piikkikannet siirrettiin tuoreeseen kasvatusliemeen ja levyjä inkuboitin +45 °C 150 rpm ravistelussa yön yli.

Kolmantena päivänä kuopat ja piikit värjättiin 0,1% kristalliviolettiliuoksella, värjäysaika 5 min. Kuopat ja piikit huuhdeltiin varovasti lämpimällä hanavedellä ja kuivattiin 90 min +45 °C lämpötilassa. Kuiviin kuoppiin pipetoitiin 70% etanolia 250 µl/kuoppa ja tyhjiin kuoppalevyihin pipetoitiin 70% etanolia 200 µl/kuoppa ja niiden päälle siirrettiin piikkikannet. Levyjä ravisteltiin 30 min 130 rpm huoneenlämmössä. Tämän jälkeen levyjen absorbanssit mitattiin Multiscan-laitteella (Multiscan FC, Thermo Scientific) 595 nm aallonpituudella.

**Vaikutus mikrobipopulaatioon.** Uuden biosidireseptin R29 vaikutusta mikrobipopulaatioon tutkittiin DNA-pohjaisilla menetelmillä. Näytteet olivat samat mitä käytettiin tehotestissä planktonisia soluja vastaan. Kontrollina prosessivesi ilman biosidia ja näytteinä prosessivedet, joissa mukana biosidi R29 pitoisuuksilla 180 ppm ja 240 ppm 3 tunnin biosidialtistuksen jälkeen. qPCR ja sekvenointi ulkoistettiin Teollisuuden Vedelle (Teollisuuden Vesi Oy, Mäntsälä), mutta näytteiden PMA (Propidium Monoazide, Biotium 40013) esikäsittely tehtiin Kemiralla. PMA on fluoresoiva väri, joka kovalenttisesti reagoi DNA:n kanssa. Väri ei pysty läpäisemään solukalvoa, joten kuolleet solut pystytään selektiivisesti leimaamaan PMA-värillä, jolloin vain elävät solut monistuvat PCR-reaktiossa. Näytteenä käytettiin kartonkitehtaan kiertovettä, jossa oli mukana pulpperoitua kuitua. Näytteet kerättiin

steriileihin näytepulloihin. 1 ml näytettä suodatettiin suodatuslaitteistolla 0,45 µm polykarbonaattisuodatinkalvon (Whatman Ø50 mm) läpi. Suodatuksen jälkeen suodatinkalvon päälle pipetoitiin 1 ml 50 µmol l<sup>-1</sup> PMA-liuosta. Valolaatikko asetettiin suodatussuppiloiden päälle ja suodattimien annettiin olla pimeässä 5 minuutin ajan. Laatikoihin kytkettiin valot ja suodattimia valotettiin 5 minuutin ajan. Valotuksen jälkeen PMA imettiin pois ja suodattimet taiteltiin aseptisesti pinseteillä pieniin putkiin.

## TULOKSET JA POHDINNAT

**Formulointityöt ja säilyvyysseuranta.** Uusia laimeampia reseptejä formuloitiin 32 kpl ja niistä resepti numero 29 (R29) erottui joukosta pysymällä värittömänä ja kirkkaana kolmen vuorokauden jälkeen +35 °C lämpötilassa. Tämän takia R29 valittiin mukaan myös tehotesteihin. Kontrollina (K) säilyvyysseurannassa oli mukana markkinoilla jo oleva tuote, jossa myös aktiivina DNBPA. Säilyvyysseurannassa testattiin myös kahta uutta stabilisaattoria (S1 ja S2) ja niiden vaikutusta tuotteiden säilymiseen. Ulkonäön seuraamisen (taulukko 1) lisäksi näytteistä analysoitiin DNBPA-pitoisuudet 5 viikon ja 7 viikon jälkeen (taulukko 2). Analyysit tehtiin nestekromatografilla Kemiran Analyttisessä laboratoriossa Espoossa.

Taulukko 1. Säilyvyyskokeissa seurattiin eri lämpötiloissa biosidiliuosten kirkkautta, väriä ja muodostuuko pinnalle faasierrosta. Mukana olivat uusi laimeampi resepti numero 29 (R29) ja kontrollina markkinoilla jo oleva biosituote (K). Testattiin myös kahta uutta stabilisaattoria (S1 ja S2) ja niiden vaikutusta liuosten säilyvyyteen. Vihreä väri tarkoittaa, että liuos on pysynyt värittömänä ja kirkkaana. Keltainen väri tarkoittaa, että liuoksen väri on alkanut muuttumaan, mutta liuos on pysynyt kirkkaana. Punainen väri tarkoittaa, että liuos on keltainen, samea tai pinnalle on muodostunut erillinen faasierros.

	0 vrk	1 vrk	3 vrk	8 vrk	9 vrk	11 vrk	15 vrk	29 vrk
R29 +5 °C								
R29 +35 °C								
R29 +40 °C								
R29 +45 °C								
R29+S1 +35 °C								
R29+S1 +40 °C								
R29+S2 +35 °C								
R29+S2 +40 °C								
K+S1 +35 °C								
K+S1 +40 °C								
K+S2 +35 °C								
K+S2 +40 °C								

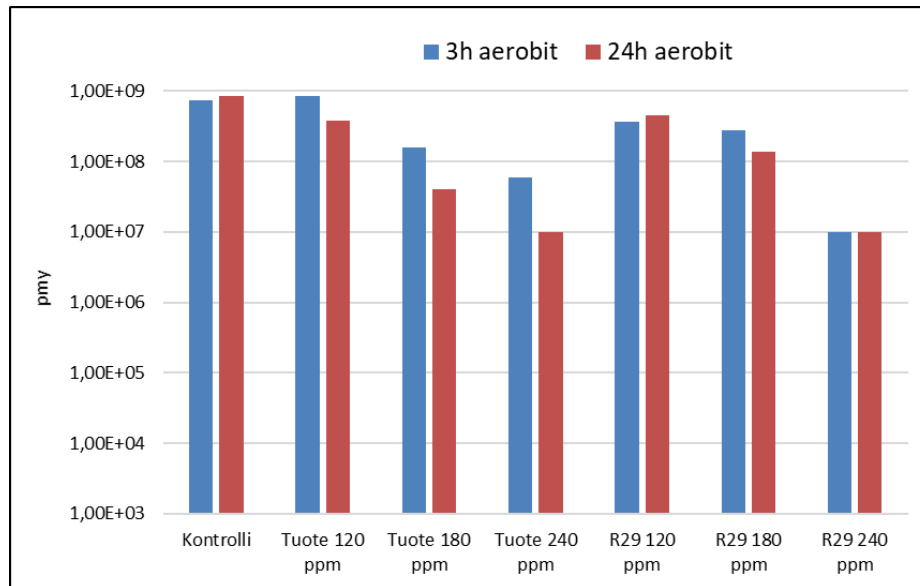
Ulkonäköä seurattaessa uusi laimeampi resepti 29 (R29) pysyi värittömänä ja kirkkaana jääkaappilämpötilassa (+5° C) koko 29 vrk. +35 °C lämpötilassa liuoksen väri oli alkanut kellertämään 29 vrk kohdalla. Korkeammissa lämpötiloissa (+40 °C ja +45 °C) liuos oli jo 8-11 vrk kohdalla muuttunut sameaksi tai pinnalla erottui selvä faasierros. Uudet testatut stabilisaattorit (S1 ja S2) eivät tuoneet parannusta säilymiseen vaan liuosten värit muuttuivat keltaisiksi jopa aiemmin.

Taulukko 2. Säilyvyytestien näytteistä analysoitiin DBNPA-pitoisuudet nestekromatografilla 5 viikon (35 vrk) ja 7 viikon (49 vrk) kuluttua liuosten valmistamisesta. Näytteitä oli säilytetty huoneenlämmössä (HL) ja +35 °C lämpötilassa. Taulukossa tuloksista on laskettu hajoamisprosentti (hajoaminen %) eli kuinka monta prosenttia DBNPA:sta on hajonnut kyseisen ajan kuluessa. Mukana olivat uusi laimeampi resepti numero 29 (R29) ja kontrollina markkinoilla jo oleva biosituote (K). Testattiin myös kahta uutta stabilaattoria (S1 ja S2) ja niiden vaikutusta liuosten säilyvyyteen.

Aika (vrk)	Hajoaminen (%)					
	R29 (HL)	R29 (+35 °C)	R29+S1 (+35 °C)	R29+S2 (+35 °C)	K+S1 (+35 °C)	K+S2 (+35 °C)
0	0	0	0	0	0	0
35	-	40,4	42,1	41,3	31,3	30
49	43,3	43,3	50,1	47,1	37	35,3

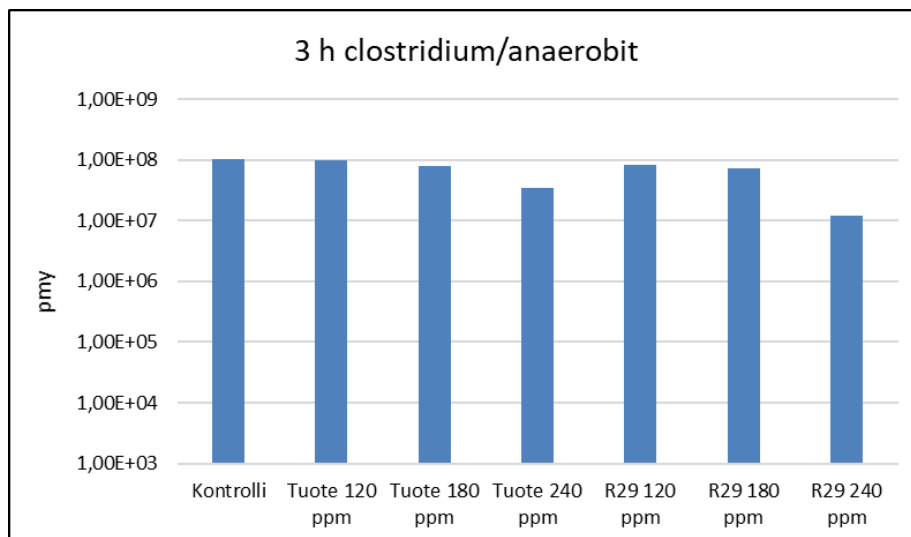
R29 oli hajonnut molemmissa niin huoneenlämmössä kuin +35 °C lämpötilassa 43,3% 7 viikon jälkeen. Uusilla stabilaattoreilla S1 ja S2 ei ollut säilyvyyttä parantavaa vaikutusta vaan päinvastoin DBNPA oli hajonnut vielä enemmän, 50,1% ja 47,1% 7 viikon jälkeen. Jo markkinoilla oleva biosidituote (K) oli säilynyt uusien stabilaattoreiden kanssa paremmin kuin R29, hajoamisprosentit 37% ja 35,3% 7 viikon jälkeen.

**Tehotestit planktonisia soluja vastaan.** Planktonisia soluja vastaan tehdyssä tehotestissä kontrollina oli kartonkitehtaan kiertovesi mihin ei lisätty biosidiä. Näytteinä oli kartonkitehtaan kiertovesi mihin oli lisätty jo markkinoilla olevaa biosidituotetta (tuote) tai uutta biosidireseptiä R29. Molempia biosidejä oli lisätty pitoisuuksina 120, 180 ja 240 ppm. Markkinoilla jo oleva tuote oli laimennettu samaan DBNPA pitoisuuteen kuin R29. Aerobiset bakteerit viljeltiin 3 tunnin ja 24 tunnin biosidialtistuksen jälkeen LNA-maljoille, laimennokset  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ja  $10^{-7}$  (kuva 3) ja anaerobiset/*Clostridium* bakteerit viljeltiin 3 tunnin biosidialtistuksen jälkeen clostridium-maljoille, laimennokset  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  ja  $10^{-6}$  (kuva 4). Maljoilta laskettiin pesäkkeet (pesäkettä muodostava yksikkö, pmy). Hiiva- ja homemaljoilla ei ollut kasvua.



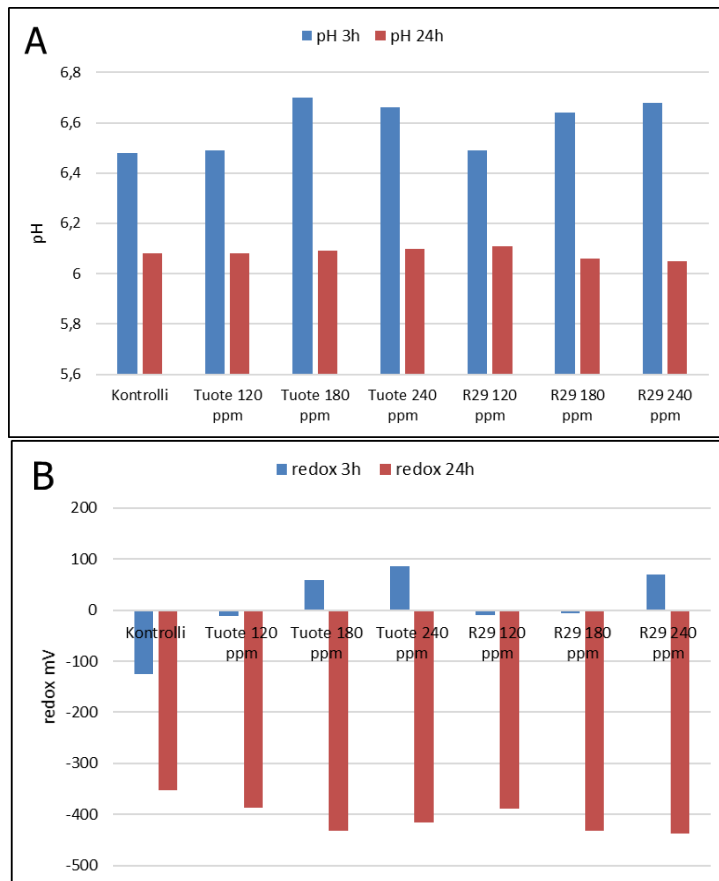
Kuva 3. Aerobiset bakteerit viljeltiin 3h (siniset palkit) ja 24h (punaiset palkit) biosidialtistuksen jälkeen LNA -maljoille, laimennokset  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ja  $10^{-7}$ . Kontrollina oli kiertovesi mihin ei oltu lisätty biosidiä. Biosideinä käytettiin markkinoilla jo olevaa tuotetta (tuote) ja uutta reseptiä R29 pitoisuuksilla 120, 180 ja 240 ppm. Maljoilta laskettiin pesäkkeet (pesäkkeitä muodostava yksikkö, pmy).

Planktonisia soluja vastaan tehdyssä tehotestissä käytetyt molemmat biosidit vähensivät aerobisten bakteerien määrää 240 ppm pitoisuudella, valmis biosidituote 3 h kuluttua 91,9% ja 24 h kuluttua 98,8% ja R29 3 h kuluttua 98,6% ja 24 h kuluttua 98,8%.



Kuva 4. Anaerobiset *Clostridium* bakteerit viljeltiin 3h biosidialtistuksen jälkeen clostridium-maljoille, laimennokset  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  ja  $10^{-6}$ . Kontrollina oli kiertovesi mihin ei oltu lisätty biosidiä. Biosideinä käytettiin markkinoilla jo olevaa tuotetta (tuote) ja uutta reseptiä R29 pitoisuuksilla 120, 180 ja 240 ppm. Maljoilta laskettiin pesäkkeet (pesäkkeitä muodostava yksikkö, pmy).

Planktonisia soluja vastaan tehdyssä tehotestissä käytetyt molemmat biosidit vähensivät anaerobisten *Clostridium* bakteerien määrää 240 ppm pitoisuudella, valmis biosidituote 3 h kuluttua 66% ja R29 88,3%.



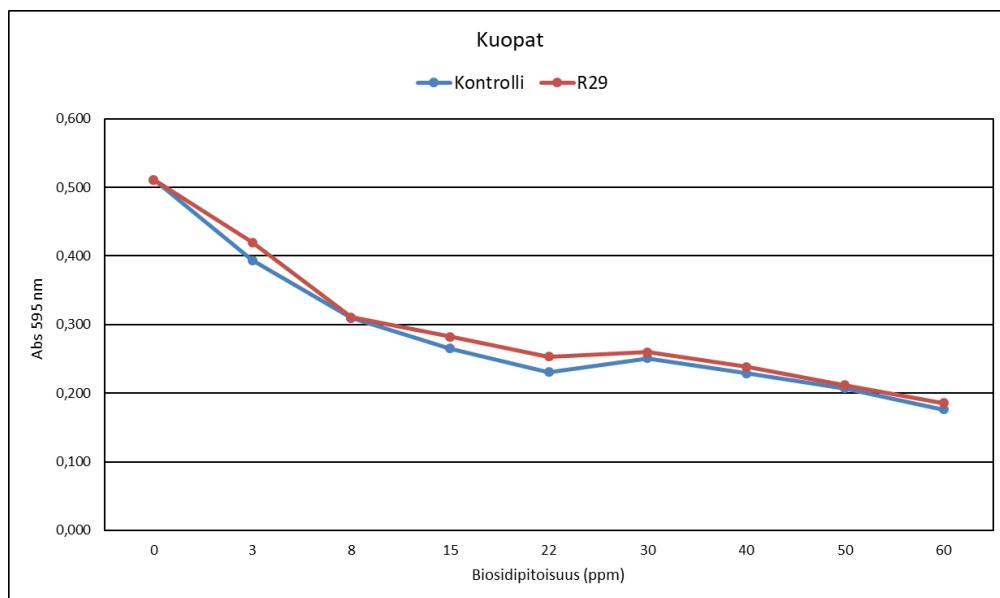
Kuva 5. Näytteistä mitattiin pH (A) ja hapetus-pelkistys (redox) potentiaalit (B) 3h (siniset palkit) biosidialtistuksen jälkeen ja 24h (punaiset palkit) biosidialtistuksen jälkeen.

Näytteiden pH-arvot olivat kolmen tunnin biosidialtistuksen jälkeen kontrollilla ja molemmilla 120 ppm näytteillä 6,5. 180 ppm ja 240 ppm näytteillä pH-arvot olivat välillä 6,6-6,7 eli hieman korkeammat. 24 tunnin biosidialtistuksen jälkeen kontrollin ja kaikkien näytteiden pH-arvot olivat laskeneet tasolle 6,1 (kuva 5A).

Hapetus-pelkistypotentiaalit olivat kontrollilla, näytteillä tuote 120 ppm, R29 120 ppm ja R29 180 ppm negatiivisen puolella kolmen tunnin biosidialtistuksen jälkeen. Muilla näytteillä redox-potentiaalit olivat positiiviset (välillä 58-86 mV). 24 tunnin jälkeen kaikki redox-potentiaalit olivat selvästi negatiiviset, välillä -353- -438 mV (kuva 5B).

**Tehotestit biofilmiä vastaan.** Biofilmitestit tehtiin 96-kuoppalevyillä, joiden päällä oli piikkikannet. Kuoppalevytulokset kertovat siitä, kuinka hyvin biosidi on estänyt bakteereiden siirtymistä vanhasta biofilmistä veteen ja edelleen biofilmin kasvua puhtaalle pinnalle. Piikkikansitulokset kertovat siitä, kuinka paljon biofilmiä irtoaa piikeistä biosidikasvatuksen aikana.

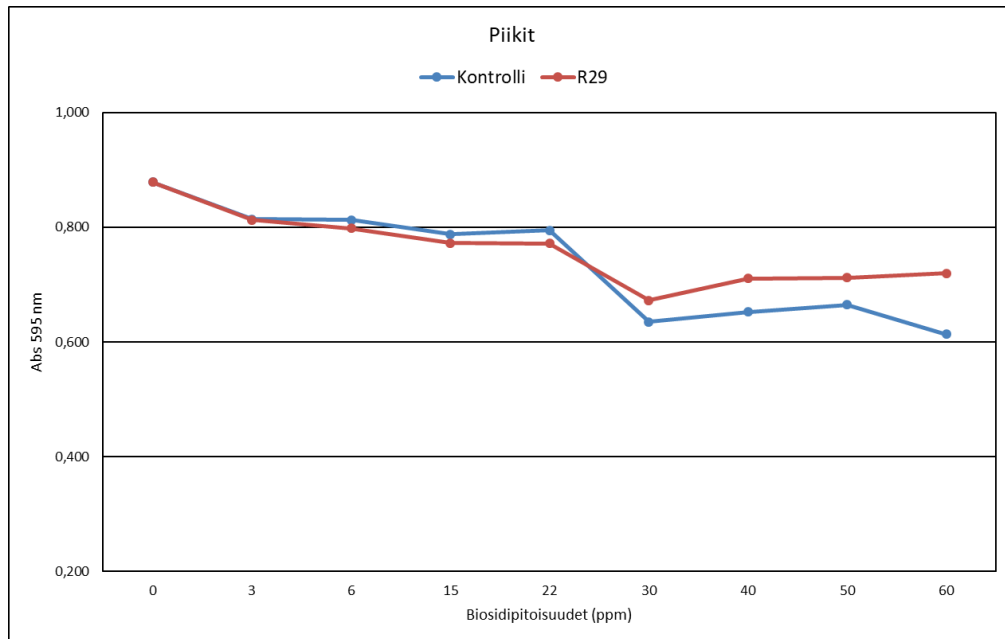
Kristalliviolettivärjäyksen jälkeen kuoppiin ja piikkeihin tarttunut väri uutettiin 70% etanolilla. Tämän jälkeen levyiltä mitattiin absorbanssit aallonpituudella 595 nm (kuvat 6 ja 7). Kontrollina käytettiin jo markkinoilla olevaa biosidituotetta, jonka aktiiviuainepitoisuus oli laimennettu samaan kuin uudessa reseptissä R29. Molemmista biosideista käytettiin pitoisuuksia 3, 8, 15, 22, 30, 40, 50 ja 60 ppm. 0 ppm näytteeseen ei lisätty biosidiä ollenkaan.



Kuva 6. Kuoppalevyjen kuoppien absorbanssit mitattiin aallonpituudella 595 nm (y-akseli). X-akselilla on käytettyjen biosidiliuosten pitoisuudet (ppm). Mitä suurempi absorbanssi, sitä enemmän biofilmiä. Kontrollina (sininen) käytettiin jo markkinoilla olevaa biosidituotetta, jonka aktiiviuainepitoisuus oli laimennettu samaan kuin uudessa reseptissä R29 (punainen). Molemmista biosideista käytettiin pitoisuuksia 3, 8, 15, 22, 30, 40, 50 ja 60 ppm. 0 ppm näytteeseen ei lisätty biosidiä ollenkaan.

Kuoppalevytulokset kertovat siitä, kuinka hyvin biosidi on estänyt bakteereiden siirtymistä vanhasta biofilmistä veteen ja edelleen biofilmin kasvua puhtaalle pinnalle.

Kuopista mitatut absorbanssit ovat laskeneet jyrkimmin välillä 0-8 ppm (0,511 → 0,311) eli jo 8 ppm pitoisuus vähentää uuden biofilmin muodostumista merkittävästi. Kontrollin ja R29 biosidin välillä ei näy eroa eli toivottua parempaa tehoa ei ole saavutettu uudella reseptillä R29.



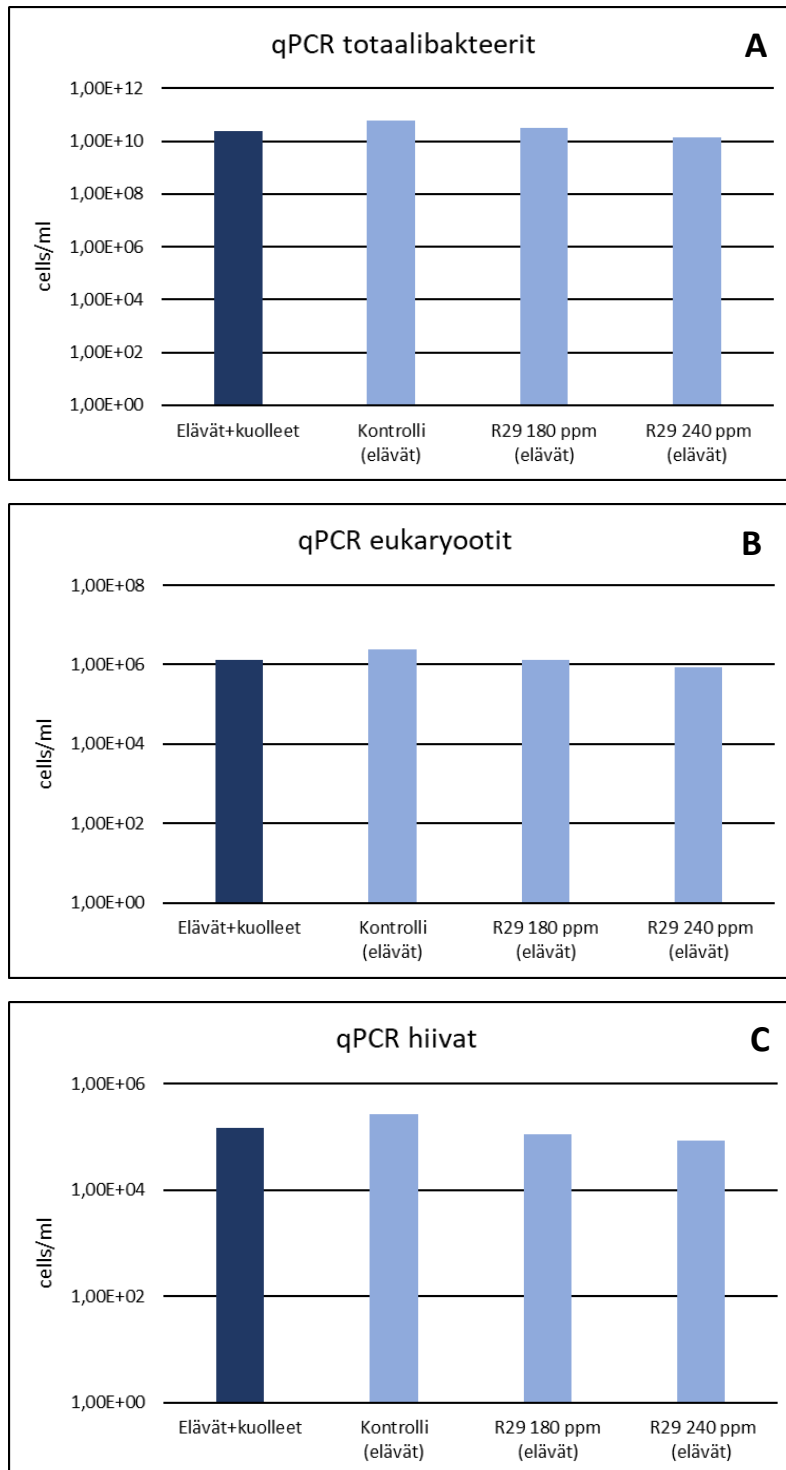
Kuva 7. Piikkikansien piikeistä uutettiin kristalliviolettiväri tyhjän kuoppalevyn kuoppiin ja absorbanssit mitattiin aallonpituudella 595 nm (y-akseli). X-akselilla on käytettyjen biosidiliuosten pitoisuudet (ppm). Mitä suurempi absorbanssi, sitä enemmän biofilmiä on irronnut. Kontrollina (sininen) käytettiin jo markkinoilla olevaa biosidituotetta, jonka aktiivaineepitoisuus oli laimennettu samaan kuin uudessa reseptissä R29 (punainen). Molemmista biosideistä käytettiin pitoisuuksia 3, 8, 15, 22, 30, 40, 50 ja 60 ppm. 0 ppm näytteeseen ei lisätty biosidiä ollenkaan.

Piikkikansitulokset kertovat siitä, kuinka paljon biofilmiä irtoaa piikeistä biosidikasvatuksen aikana. Biosidien vaikutus piikeistä irtoavaan biofilmiin nähdään välillä 22-30 ppm (absorbanssit 0,78 → 0,65). Alle 22 ppm pitoisuuksilla absorbanssit pysyvät melko tasaisesti 0,80 tasolla ja 30 ppm suuremmilla pitoisuuksilla biofilmin irtoaminen tasoittuu. Kontrollin ja R29 biosidin välillä ei näy tässäkään tapauksessa suurta eroa eli toivottua parempaa tehoa ei ole saavutettu uudella reseptillä R29.

**Vaikutus mikrobipopulaatioon.** Biosidien vaikutusta mikrobipopulaatioon tutkittiin DNA-pohjaisilla menetelmillä. Tämä osa ulkoistettiin Teollisuuden Vesi Oy:lle. Näytteiden PMA-esikäsittely tehtiin Kemiralla. PMA leimaa kuolleet solut ja vain elävät solut monistuvat PCR:ssä.

qPCR:ssä käytettiin kolmia eri alukkeita, totaalibakteerit, eukaryootit ja hiivat. Kontrollina oli PMA käsitelty prosessivesi ilman biosidia (elävät solut). Näytteinä olivat PMA käsitellyt prosessivedet, joissa R29 biosidiä pitoisuuksilla 180 ppm ja 240 ppm (elävät solut). qPCR:ssä oli mukana myös prosessivesi ilman biosidia ja ilman PMA käsittelyä (elävät+kuolleet solut) (kuva 8).





Kuva 8. qPCR:ssä käytettiin kolmia eri alukkeita, totaali bakteerit (A), eukaryootit (B) ja hiivat (C). Kontrollina oli PMA käsitelty prosessivesi ilman biosidia, näytteinä olivat PMA käsitellyt prosessivedet R29 biosidin kanssa pitoisuuksilla 180 ppm ja 240 ppm 3 tunnin biosidialtistuksen jälkeen (elävät solut, vaaleansiniset palkit). qPCR:ssä oli myös mukana prosessivesi ilman PMA käsittelyä ja ilman biosidia (elävät+kuolleet solut, tummansiniset palkit). Kaikilla alukkeilla eläviä soluja oli enemmän kuin eläviä+kuolleita soluja.

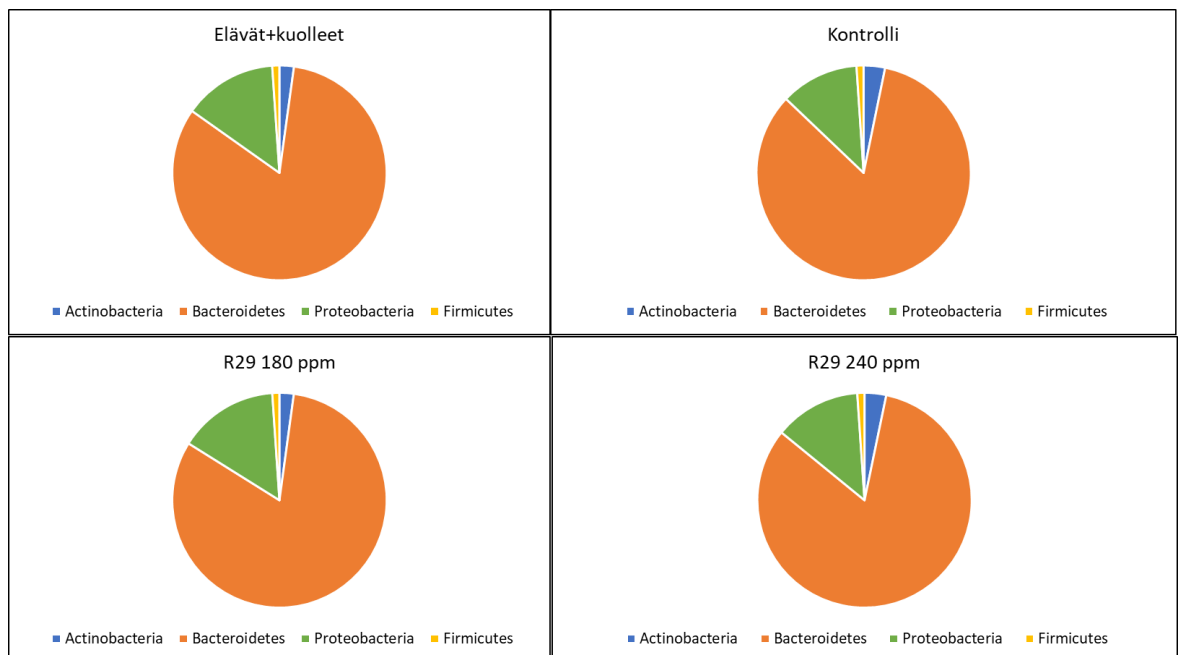
qPCR:ssä kaikilla alukkeilla eläviä soluja oli enemmän kuin eläviä+kuolleita soluja. Todennäköisesti soluja oli niin paljon, että PMA:n määrä ei riittänyt erottamaan eläviä ja kuolleita soluja toisistaan. Biosidin vaikutusta ei pystytäkään tästä syystä havaitsemaan.

Sekvensoinnin tulokset esitetään tässä työssä pääjakso tasolla. Tarkemmat tiedot bakteerikannoista ovat salaista tietoa. Näytteistä löytyneet bakteerit kuuluvat neljään pääjaksoon, *Actinobacteria* (2-3%), *Bacteroidetes* (76-78%), *Proteobacteria* (11-14%) ja *Firmicutes* (1%) (taulukko 3, kuva 9). Kontrollina oli PMA käsitelty prosessivesi ilman biosidia (elävät solut). Näytteinä olivat PMA käsitellyt prosessivedet, joissa R29 biosidiä pitoisuuksilla 180 ppm ja 240 ppm (elävät solut). qPCR:ssä oli mukana myös prosessivesi ilman biosidia ja ilman PMA käsittelyä (elävät+ kuolleet solut) (taulukko 3, kuva 9.)

Taulukko 3. Sekvensoinnissa näytteistä löytyi bakteereita neljästä eri pääjaksosta, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ja *Firmicutes*.

	Elävät+kuolleet	Kontrolli	R29 180 ppm	R29 240 ppm
<b>Actinobacteria</b>	<b>2%</b>	<b>3 %</b>	<b>2 %</b>	<b>3 %</b>
<b>Bacteroidetes</b>	<b>76 %</b>	<b>78 %</b>	<b>76 %</b>	<b>76 %</b>
<b>Proteobacteria</b>	<b>13 %</b>	<b>11 %</b>	<b>14 %</b>	<b>12 %</b>
<b>Firmicutes</b>	<b>1 %</b>	<b>1 %</b>	<b>1 %</b>	<b>1 %</b>
	<b>92%</b>	<b>93%</b>	<b>93%</b>	<b>92%</b>

Sekvensoinnin tuloksista näkyy sama ongelma kuin qPCR:ssä. PMA käsittely ei ole pystynyt erottelamaan eläviä ja kuolleita soluja toisistaan. Biosidin vaikutusta mikrobiopopulaatioon ei pystytä havaitsemaan (kuva 9.)



Kuva 9. Sekvensoinnissa paperikoneesta löytyi bakteereita neljästä pääjaksosta, *Actinobacteria* (sininen), *Bacteroidetes* (oranssi), *Proteobacteria* (vihreä) ja *Firmicutes* (keltainen). Kontrollina oli PMA käsitelty prosessivesi ilman biosidia, näytteinä olivat PMA käsitellyt prosessivedet R29 biosidin kanssa pitoisuuksilla 180 ppm ja 240 ppm 3 tunnin biosidialtistuksen jälkeen. Mukana prosessivesi ilman PMA käsittelyä ja ilman biosidia (elävät+kuolleet solut).

Uusi biosidiresepti numero 29 (R29) oli ainoa uusista resepteistä, joka säilyi kirkkaana ja värittömänä lähes kolme viikkoa +35 °C lämpötilassa. Analysoitaessa aktiiviatteen pitoisuutta havaittiin, että DBNPA oli kuitenkin hajonnut viidessä viikossa 40,4% ja seitsemässä viikossa 43,3%. Testatuista uusista stabilaattoreista (S1 ja S2) ei ollut apua säilymisen parantamiseen. R29 oli näiden stabilaattoreiden kanssa hajonnut jopa enemmän. Biosidituotteen säilyvyyttä ei pystytty parantamaan.

R29 tehosi planktonisia soluja vastaan. 240 ppm pitoisuus tappoi 3 tunnin biosidialtistuksella jopa 98,6% bakteereista ja 24 tunnin jälkeen 98,8%. Kuitenkaan merkittävää parannusta verrattuna jo markkinoilla olevaan tuotteen tehoon ei saavutettu tällä reseptillä.

R29 pystyi estämään uuden biofilmin muodostumista jo 8 ppm pitoisuudella ja se myös vähensi biofilmin irtoamista pitoisuuksilla 22-30 ppm. Myöskään tässä kohdassa tehon parannusta verrattuna jo markkinoilla olevaan tuotteen tehoon ei saavutettu.

DNA-pohjaisilla menetelmillä ei myöskään pystytty havaitsemaan R29 biosidin vaikutusta mikrobipopulaatioon. Tämä todennäköisesti johtui PMA-esikäsitteystä. Bakteerisoluja oli ilmeisesti niin paljon, että käytetty PMA-pitoisuus ei riittänyt erottelemaan eläviä ja kuolleita soluja.

Jostain syystä miselliteknologian tuomaa parannusta tehoon ei saatu onnistumaan tällä kertaa. Reseptejä kannattaa kehittää vielä lisää ja jatkaa niiden kanssa tehotestausta.

## LÄHTEET

1. **Blanco MA, Negro C, Gaspar I, Tijero J (1996)** Slime problems in the paper and board industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 46 Issue 3: 203-208
2. **Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F (2001)** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* Vol. 27 No. 9: 1017-1032
3. **Bunnage W, Singleton F L, Cross K (2000)** Inhibitor Treatment Program Offers Option for Clearing Biofilm Buildup. *Pulp&Paper* June 2000: 72-81
4. **Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell D E, Korber D R, Lappin-Scott H (1995)** Microbial Biofilms. *Annuals Rev. Microbiol.* 49: 711-745
5. **Davis C K, Casini G (2003)** Biocide Controls Microbes Without Adverse Impacts on Papermaking. *Pulp&Paper* Feb 2003: 40-43
6. **De Beer D, Srinivasan R, Stewart P S (1994)** Direct measurements of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied Environmental Microbiology* 60: 4339-4344
7. **De Beer D, Stoodley P (2013)** Microbial biofilms (Chapter 13). *The prokaryotes- Applied Bacteriology and Biotechnology* s.343-366
8. **Desjardins E, Beaulieu C (2003)** Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30: 141-145
9. **Eachus A C, Pohlman J L (2004)** Applications of 2,2-Dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA), A Non-Traditional Antimicrobial Agent, in Metalworking Fluid Production and Use. *Tribology & Lubrication Technology* Dec 2004 60 12: 42-47
10. **Ekman J, Kosonen M, Jokela S, Kolari M, Korhonen P, Salkinoja-Salonen M (2007)** Detection and quantitation of colored deposit-forming *Meiothermus* spp. in paper industry processes and end products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* March 2007 Volume 34 Issue 3: 201-211
11. **Flemming H-C, Meier M, Schild T (2013)** Mini-review: microbial problems in paper production. *Biofouling* DOI:10.1080/08927014.2013.798865
12. **Granhall U, Welsh A, Throbäck I N, Hjort K, Hansson M, Hallin S (2010)** Bacterial community diversity in paper mills processing recycled paper. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37: 1061-1069

13. **Jang A, Szabo J, Hosni A A, Coughlin M, Bishop P L (2006)** Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 368-376
14. **Kiuru J, Tsitko I, Sievänen J, Wathén R (2010)** Optimization of bioside strategies on fine paper machines. *BioResources* 5(2): 514-524
15. **Klahre J, Flemming H-C (2000)** Monitoring of biofouling in papermill process waters. *Water Research* Vol. 34 No. 14: 3657-3665
16. **Kolari M, Nuutinen J, Salkinoja-Salonen M S (2001)** Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 343-351
17. **Kolari M, Schmidt U, Kuismanen E, Salkinoja-Salonen M S (2002)** Firm but Slippery Attachment of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of Bacteriology* May 2002: 2473-2480
18. **Kolari M, Nuutinen J, Rainey F A, Salkinoja-Salonen M S (2003)** Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30: 225-238
19. **Kolari M (2007)** Paper machine microbiology (chapter 6). *Papermaking Chemistry*. 2. painos, Jyväskylä, Finnish Paper Engineers' Association/Paperi ja Puu Oy
20. **Kurissery S R, Kanavillil N, Leung K T, Chen A, Davey L, Schraft H (2010)** Electrochemical and microbiological characterization of paper mill biofilms. *Biofouling* 26: 799-808
21. **Lahtinen T, Kosonen M, Tirola M, Vuento M, Oker-Blom C (2006)** Diversity of bacteria contaminating paper machines. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33: 734-740
22. **Mah T-F C, O'Toole G A (2001)** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology* Vol.9 no.1 January 2001: 35-39
23. **Madigan M T, Bender K S, Buckley D H, Sattley W M, Stahl D A (2017)** *Brock Biology of Microorganisms*. 15. painos, New York, Pearson
24. **Neyret C, Herry J-M, Meylheuc T, Dubois-Brissonnet F (2014)** Plant-derived compounds as natural antimicrobials to control paper mill biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41: 87-96
25. **Paulus W (2005)** *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*. The Netherlands, Springer 2005

26. **Pereira M O, Vieira M J, Beleza V M, Melo L F (2001)** Comparison of two biocides- Carbamate and glutaraldehyde- In the control of fouling in pulp and paper industry. *Environmental Technology* Vol. 22: 781-790
27. **Rochex A, Lebeault J-M (2007)** Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water Research* 41: 2885-2892
28. **Sikorski J and 31 others (2010)** Complete genome sequence of *Meiothermus silvanus* strain (VI-R2<sup>T</sup>). *Standards in Genomic Sciences* 3: 37-46
29. **Stewart P S, Grab L, Diemer J A (1998)** Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *Journal of Applied Microbiology* 85: 495-500
30. **Tenreiro S, Nobre MF, da Costa MS (1995)** *Thermus silvanus* sp. nov. and *Thermus chliarophilus* sp. nov., two new species related to *Thermus ruber* but with lower growth temperatures. *Int J Syst Bacteriol* 45:633-639
31. **Tirola M, Lahtinen T, Vuento M, Oker-Blom C (2009)** Early succession of bacterial biofilms in paper machines. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36: 929-937
32. **Väisänen O M, Nurmiäho-Lassila E-L, Marmo S A, Salkinoja-Salonen M S (1994)** Structure and Composition of Biological Slimes on Paper and Board Machines. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 641-653
33. **Väisänen O M, Weber A, Bennasar A, Rainey F A, Busse H-J, Salkinoja-Salonen M S (1998)** Microbial communities of printing paper machines. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1069-1084
34. **Watnick P, Kolter R (2000)** Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* May 2000: 2675-2679
35. **Zumsteg A, Urwyler S K, Glaubitz J (2017)** Characterizing bacterial communities in paper production- troublemakers revealed. *MicrobiologyOpen* 2017; 6:e487